

2013
No.149

ISSN 0385-1516

**DOJIN**

NEWS

ドージンニュース

CONTENTS

●Review

ES/iPS細胞から内胚葉組織への分化
誘導方法の開発

熊本大学 白木伸明・桑昭苑

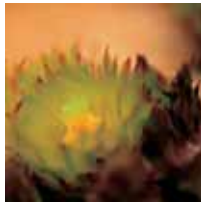
連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
—最近の展開(バイオからエネルギーまで)④
九州大学大学院 中嶋直敏・藤ヶ谷剛彦

●Topics on Chemistry

レドックス応答性タンパク質チオール
解析用試薬 DNAマレイミド

株式会社同仁化学研究所
加治屋いづみ・大内雄也



CONTENTS

Review

ES/iPS細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発 ●—— [1]

熊本大学

白木 伸明・桑 昭苑

連載

新しいナノ材料としてのカーボンナノチューブ
—最近の展開（バイオからエネルギーまで）④ ●—— [8]

九州大学大学院

中嶋 直敏・藤ヶ谷 剛彦

Topics on Chemistry

レドックス応答性タンパク質チオール解析用試薬

DNA マレイミド ●—— [11]

株式会社同仁化学研究所 加治屋 いずみ・大内 雄也

Commercial

新製品

内胚葉分化モニタリングキット ●—— [7]

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体 ●—— [16]

開発中

硫化水素研究用試薬およびキット ●—— [13]

試作品

N⁶-2AE-NAD ●—— [15]

バイオセンサ向けホスホン酸誘導体 ●—— [15]

お知らせ

日経バイオテク ONLINE の紹介 ●—— [12]

パンフレットのご案内 ●—— [12]

販売中止予定のお知らせ ●—— [14]

第 24 回フォーラム・イン・ドージン開催報告 ●—— [18]

新製品案内

*容量・価格等の詳細は各ページをご覧ください。

内胚葉分化モニタリングキット

ES/iPS Differentiation Monitoring

Kit - Human Endoderm

ES/iPS Differentiation Monitoring

Kit - Mouse Endoderm

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体

11-AUPA

10-CDPA

FHPA

FOPA

FDPA

M-EG₃-UPA

11-HUPA

11-NUPA

ODPA

11-PIUPA

ES/iPS 細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発

The establishment of endoderm differentiation methods of ES/iPS cells



白木 伸明

熊本大学発生医学研究所 幹細胞部門
多能性幹細胞分野 助教



桑 昭苑

熊本大学発生医学研究所 幹細胞部門
多能性幹細胞分野 教授

Embryonic stem (ES) and Induced Pluripotent Stem (iPS) cells are expected to use for regenerative medicine, and also serve a highly useful tool in the study of developmental biology. The embryonic endoderm requires signals from the adjacent germ layers for subsequent regionalization into specific endoderm organs. The requirement of inducing signal from the mesoderm led to the idea that coculture of ES cells with a feeder cell line would induce the ES cells to differentiate into the definitive endoderm. This led to the discovery of M15, a mesonephros derived cell line, which has been shown to be an excellent endoderm inductive source. To establish optimal conditions for differentiation into pancreas, liver or intestinal cell lineages, ES cell were differentiated into definitive endoderm (DE) and were challenged with various growth factors or chemicals that affect certain signaling pathways at late stage. Among these tested growth factors and chemicals, we found that activin and FGF signals promote pancreatic differentiation, dexamethasone and HGF induce hepatic differentiation or the activation of Wnt and inhibition of Notch signaling pathways efficiently induced intestinal differentiation. Moreover, we established non-feeder systems using synthesized basement membrane or nanofiber as a scaffold for endoderm differentiation. To identify endoderm or pancreas specific genes in ES cell-differentiation, we induced mouse ES cells into the mesendoderm, DE, mesoderm, ectoderm and Pdx1-expressing pancreatic lineages, and performed DNA microarray analysis. Genes specifically expressed in the DE and/or in Pdx1-expressing cells were extracted and their expression patterns in normal embryonic development were studied by *in situ* hybridizations. This review describes the establishment of endoderm differentiation methods of ES/iPS cells, and application of these differentiation systems into the study of developmental biology.

キーワード: ES 細胞、iPS 細胞、内胚葉、分化誘導、M15 細胞、sBM

1. はじめに

2012年の山中伸弥京都大学教授のノーベル医学生理学賞の受賞以降、幹細胞を利用した再生医療への関心は非常に高まっている。1型糖尿病患者への治療法としては膵臓移植、あるいは膵島移植が有効であることが知られている。移植効果が次第に低下し再度移植が必要となるなど、さらなる改善が必要ではあるが、数年間インスリン治療から離脱できることや移植前に比べ血糖のコントロールが容易になる利点がある。しかし、ドナー不足という大きな問題点があるために移植細胞を得る方法としてES細胞/iPS細胞からの膵β細胞誘導が注目されている。我々は、ES細胞(embryonic stem cell / 胚性幹細胞)およびiPS細胞(induced pluripotent stem cell / 人工多能性幹細胞)からの内胚葉分化誘導機構について研究を行ってきた。主に膵臓の発生・分化について研究を行ってきたが、他の内胚葉組織である肝臓・腸への分化研究も行っている。我々は、これまで分化をサポートする材料として胎仔膵臓組織、支持細胞、擬似基底膜、ナノファイバーを用いることで、簡便かつシンプルな分化誘導技術の構築を目指してきた。支持細胞を用いた分化誘導系に関しては、培養液の組成を変更することにより膵臓・肝臓・腸といった内胚葉組織のみならず、外胚葉・中胚葉系細胞を効率よく分化誘導することに成功している。さらに、構築したES細胞分化誘導系で得られた各種分化細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、胚性内胚葉の新規細胞表面抗原マーカーとしてDAF1(CD55)を見出した。更なる解析の結果、内胚葉もしくは膵臓での発現の報告がない4つの新規遺伝子を同定した。以上のように、我々は再生医療やモデル細胞作

製にむけたES細胞分化誘導系の構築を行いつつ、得られた知見について発生学的解析手法を用いて検証して、ES細胞の分化誘導系が初期の発生現象を理解することのツールとして非常に優れていることを証明してきた。本総説では、膵臓分化誘導の現状について解説し、我々が構築した各種分化誘導法、分化誘導効率の可視化方法を述べ、最後にES細胞研究から得た知見を発生研究へと応用した例について述べる。

2. 膵臓分化誘導の現状

ヒトES/iPS細胞が再生医療の材料として有用であることは上述の通りであるが、糖尿病の再生医療に関しては、細胞レベルで機能を有している膵β細胞を補充する細胞移植であることから早期の臨床応用が期待されている。本章では、ES/iPS細胞から膵β細胞への分化誘導の現状を紹介する。

図1に卵から膵β細胞に至るまでの発生系譜の模式図を示す。初期胚は、外・中・内胚葉と呼ばれる3つの細胞層からなり、膵臓は胚性内胚葉由来の臓器である。膵臓発生はまず、マウスにおいて胎生8.5日前後に内胚葉上皮の特定領域に膵前駆細胞の誘導が起こることで開始される。その後、膵前駆細胞は増殖し、胎生10.5日目頃には、背側と腹側にそれぞれ膵芽と呼ばれる構造が形成される。さらに発生が進むと、胎生14.5日目頃には、内分泌細胞および外分泌細胞が分化し始める。内分泌細胞は4種の細胞に分類され、最初にグルカゴンを分泌するα細胞が分化して出現し、その後インスリンを分泌するβ細胞、ソマトスタチンを分泌するδ細胞および膵ポリペプチドを分泌するpancreatic polypeptide

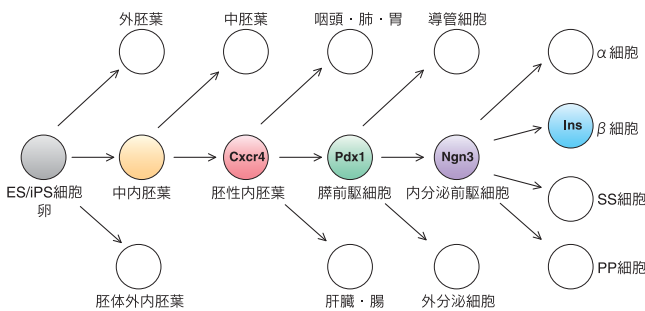


図1 膵臓の発生細胞系譜とマーカー遺伝子

(PP)細胞が分化してくる。ES/iPS細胞から膵臓を分化誘導する際も図1に示すようなマーカー遺伝子の発現を指標として、初期胚から膵β細胞への正常な発生分化過程を再現するという手法がとられている。また、肝臓・腸なども内胚葉由来臓器であり、膵臓の場合と同様に正常発生において知られている誘導シグナルをES細胞へ与えることで、それぞれの組織への分化誘導が試みられている。

膵臓は胚性内胚葉由来の臓器であるが、ES細胞からは胚性内胚葉の他にも、将来、胚体外組織を形成する胚体外内胚葉というものも分化する(図1)。この胚体外内胚葉では、多くの胚性内胚葉マーカーが発現していることもわかっている。そのため、ES細胞から正常発生に沿った形で膵β細胞を得るために胚性内胚葉を介した分化誘導を行う場合、初期に分化した内胚葉が胚性内胚葉なのか胚体外内胚葉なのかを区別することが困難な時期が続いた。この問題は、2005年にYasunagaら¹⁾によりマウスES細胞から、またD'Amourら²⁾によりヒトES細胞から胚性内胚葉への効率的な分化誘導方法、さらにはCxcr4という分子が胚性内胚葉のみに発現し、胚体外内胚葉には発現しないということが報告され、ようやく解決された。彼らは、ES細胞を無血清条件下でアクチビン含有培地を用いて培養することにより、マウスおよびヒトES細胞から非常に効率的に胚性内胚葉が分化したと報告した。同定されたCxcr4分子が胚性内胚葉のマーカーとして頻繁に使われるようになった。2005年に米国のNovocell社(現ViaCyte社)のD'AmourらによってヒトES細胞から内胚葉細胞を効率的に分化誘導する方法²⁾が報告されて以降は、この方法を元に様々な分化誘導方法が開発されてきた。2006年にはヒトES細胞から胚性内胚葉を介して正常発生に沿った形でインスリンを産生する膵β細胞を分化誘導することに成功したと報告した³⁾。一方、成熟化に関しては、得られたインスリン産生細胞はグルコース値に応じてインスリン生成量を変えることがあまりできず、課題も残っていた。そこで、彼らはより成熟した細胞を得るために膵β細胞へ分化途中の細胞をマウスへ移植し、*in vivo*で成熟化させるという戦略をとり、ヒトES細胞由来膵臓細胞がマウス体内で成熟し、正常に機能することを示した⁴⁾。図2にはこれまで報告されているヒトES細胞から膵β細胞への分化誘導方法について模式的にまとめたが、2006年のD'Amourの方法を基本として、様々な改良がなされてきたことがわかる⁵⁻⁹⁾。

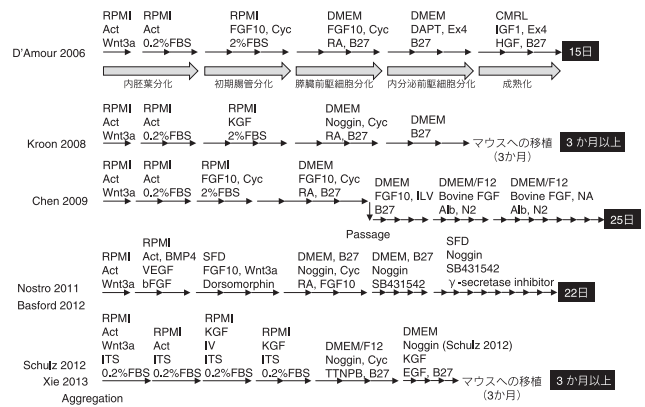


図2 ヒトES細胞から膵臓への分化誘導法。

Act = Activin, RA = Retinoic acid, NA = Nicotinamide, ILV = Indolactam V, IV = Tgfb β 1 kinase inhibitor IV, TTNPB = RAのアナログ

3. 分化誘導方法の構築

ES/iPS細胞から目的の組織を分化誘導するためには、最適な足場と培養液の組み合わせが必要である。本章では、我々が構築してきた分化誘導系を紹介するとともに足場および培養液に焦点を絞って、誘導方法構築のプロセスについても解説したい。

3-1. マウス胎仔膵組織を用いた膵臓分化誘導

膵臓は内胚葉由来の臓器であり、膵β細胞は膵前駆細胞・内分泌前駆細胞を介して発生する。我々が膵臓分化誘導研究を開始した当初は、ES細胞分化における膵臓分化の誘導シグナル源についての情報はほとんどなかった。そこで、我々は、ES細胞をマウス胎仔の各臓器と共培養することにより膵前駆細胞への分化誘導を試みた。評価には、膵臓前駆細胞マーカーである*Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) 遺伝子座に*LacZ*が導入された*Pdx1/LacZ* ES細胞を用いた。検討の結果、ES細胞とマウス胎仔膵原基あるいは膵間充織とを共培養すると、膵前駆細胞への分化誘導が促進されることを見いだした¹⁰⁾(図3)。また、各種液性因子の膵分化誘導に及ぼす影響について評価した結果、膵前駆細胞への分化には液性因子としてTGFβ 2 が有効であった。さらに、いくつかの外来遺伝子をES細胞に強制導入し、膵臓への分化に対する導入遺伝子の効果を調べた。その結果、内胚葉誘導活性を持つニワトリの*cmix*遺伝子をマウスES細胞内で強制発現することにより、膵原基およびTGFβ 2 が持つ膵分化誘導活性が増強し、その増強効果は*cmix*蛋白質の発現量と相関した。

3-2. 支持細胞M15を用いた分化誘導

上記の研究で胎仔膵原基に膵臓分化誘導シグナルが存在することは明らかになったが、分化誘導機序の解明には、より簡便で効率的な方法が必要であった。正常発生において内胚葉は近接する中・外胚葉領域からのシグナルを受けて前後軸に沿った領域化が決定されることが報告されていた。そこで、中胚葉由来の培養細胞株を誘導シグナル源として利用する分化方法の樹立を試みた。複数種の細胞株について膵分化誘導活性を調べた結果、中胚葉由来培養細胞株M15細胞に誘導活性を見出し、M15細胞を支持細胞として用いる、新しい膵分化誘導法の構築に成功した¹¹⁾(図3)。分化誘導方法の開発および誘導後の細胞の解析には、*Pdx1*プロモーター下にGFP (Green Fluorescent Protein)を導入した組み

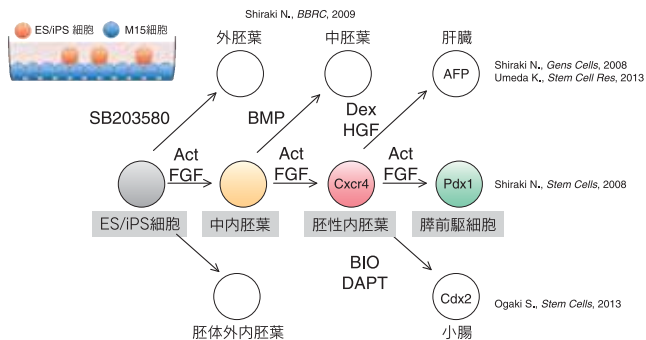


図3 分化に影響を及ぼす成長因子・低分子化合物

換え遺伝子をホモに持つ遺伝子組み換えマウスの胚盤胞から樹立した *Pdx1*/GFP ES 細胞を用いた。各種マーカーの発現解析の結果、上記分化誘導法により ES 細胞から胚様体を介さずに内胚葉を選択的に分化誘導することが可能であり、膵臓のみならず、他の内胚葉由来臓器（咽頭、肺、肝臓、小腸）マーカーの発現が認められた。さらに、スクリーニングに使用した細胞株についてマイクロアレイ解析を行い、M15 細胞のもつ分化促進能力の本体について解析を行った。解析の結果、膵臓分化に関して、Activin, FGF (Fibroblast growth factors), レチノイン酸・接着因子の関与が示唆された。そこで、M15 細胞と Activin および FGF の添加を組み合わせることで ES 細胞から非常に効率よく膵前駆細胞を分化誘導できる方法を確立できた。定量的な解析の結果、支持細胞のみの場合に得られる膵前駆細胞は約 2% 程度であったが、液性因子を添加することで約 30% と飛躍的に増加した (図 3)。得られた膵前駆細胞については、マウスへの移植実験を行い、膵臓を構成するすべての細胞へ分化可能であることがわかった。

肝臓は創薬研究において中心的役割を果たす臓器であるが、新薬候補物質の体内での代謝および薬物毒性試験などにおいて、動物肝細胞とヒト肝細胞では物質代謝の大きな違いがあることから、動物実験だけでは毒性と有効性の検定が不可能である。またヒト肝細胞の供給も極めて限定されており、多数の提供者から集められた細胞組織では試験データのばらつきが大きく有意な結果を得ることは困難である。そこで、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術が確立できれば、安定したヒト肝細胞の供給が可能となり、創薬研究分野における極めて重要な技術革新となる。我々は、まず、マウス ES 細胞を用いて培養条件の最適化を行い、先の研究で見いだした膵臓分化誘導条件から、少しずつ培養条件を変えていくことにより、肝臓分化に最適な培養液の組成を決定した。最終的には膵臓分化誘導活性を有する Activin と FGF を除去し、代わりに HGF (Hepatocyte growth factor)、Dex (Dexamethasone) などを添加することで非常に効率よく肝臓分化を誘導できた¹²⁾ (図 3)。本方法は、マウス ES 細胞のみならずヒト ES 細胞にも応用可能であり、ES 細胞由来の肝臓細胞を利用することで、肝臓分化機序のさらなる解明や新薬の安全性評価および薬理評価への応用が期待される。

小腸上皮は、食物や薬物を吸収・代謝する重要な組織である。これまでは、ヒト結腸癌由来細胞株 Caco2 細胞が創薬における薬物動態試験のモデルとして汎用されている。しかし、Caco2 細胞は小腸上皮に比べると薬物代謝活性が低く、培養方法によって細胞の性質に大きな差が生じるなど、問題点が多い。近年、成体の

腸幹細胞研究は盛んであるが、ES/iPS 細胞からの分化誘導研究はあまり行われていなかった。そのため、小腸への分化誘導についても、まずは肝臓の場合と同様に支持細胞を用いて分化誘導した内胚葉に対して、様々な成長因子・低分子化合物を添加して培養を行うこととした。膵臓マーカーである *Pdx1*、初期肝臓マーカーである α -fetoprotein (AFP)、小腸マーカー遺伝子 *Cdx2* の発現を指標に、小腸上皮細胞への分化を選択的に促進する条件を探索した。様々な条件検討の結果、内胚葉分化誘導後に WNT シグナルを活性化させる化合物 BIO と Notch シグナルを抑制する化合物 DAPT を加えることにより、小腸上皮の細胞への分化が促進され、全体の 88% 程度の細胞が *Cdx2* 陽性の小腸上皮の細胞へと分化した¹³⁾ (図 3)。またこの分化過程には *Fgf* や *Bmp* (Bone Morphogenetic Protein), hedgehog シグナルも関与していることが示唆された。分化した小腸内胚葉から、吸収腸細胞・杯細胞・パネート細胞および腸管内分泌細胞の分化細胞が誘導できることも確認している。今後はこの細胞を用いた小腸の発生メカニズムや炎症性腸疾患の病因解明などの基礎研究と創薬や再生医療などの応用研究が期待できる。

ES 細胞から各胚葉を誘導する技術については、多くの報告があるが、一つの系で三胚葉への分化を同時に観察できる分化誘導系の報告はなかった。我々は、上述のように中胚葉由来の培養細胞株 M15 細胞を用いて内胚葉組織である膵臓・肝臓および腸といった内胚葉組織を効率的に分化誘導する方法を構築してきた。これらの研究で得られた知見を参考にして、M15 細胞と液性因子の添加を組み合わせることにより、ES 細胞から内胚葉のみならず中胚葉および外胚葉を効率よく分化誘導することに成功した。Activin および bFGF を添加することにより中内胚葉・内胚葉を、BMP7 を添加することにより中胚葉を、P38MAPK の阻害薬である SB203580 を添加することにより神経外胚葉を効率的に分化誘導することができた¹⁴⁾ (図 3)。分化誘導した各細胞について、マイクロアレイ解析を行った結果、各種マーカー遺伝子の発現を確認できた。この各胚葉におけるマイクロアレイ解析の結果を元に、後述する新規内胚葉マーカーの探索や内胚葉分化効率の簡便な測定 Kit の開発などの研究がスタートした。さらに長期培養を行った結果、神経系ではニューロンのみならずアストロサイトやオリゴデンドロサイトへの分化、中胚葉系では骨や脂肪細胞への分化が見られた。以上のことから、M15 細胞を用いて分化誘導した細胞は、成熟した神経および中胚葉へ分化する能力を有していることが明らかになった。

上記の M15 細胞を用いた内胚葉組織（膵臓・肝臓・小腸）、中胚葉および外胚葉への分化誘導方法の構築過程で、足場の条件は同じであっても、培養液組成のみを変更されることにより、分化をコントロールすることが可能であることが明らかとなった。このことは、その後の我々の分化誘導研究において非常に大きな影響を与える知見であった。

3-3. 擬似基底膜 (sBM) を用いた分化誘導

続いて、M15 細胞の ES 細胞への働きかけを調べるために二つの実験を行った。まず、同じ培養液で異なる細胞群を個別に培養可能なトランスウェルを用いた共培養系を用い、M15 細胞の液性因子の影響を調べたところ、初期の内胚葉誘導においては液性因子が重要であるが、その後の臓器特異的分化には強い影響が認められなかった。一方、M15 細胞をバラホルムアルデヒドで固定しても、その膵臓分化促進効果は失われなかった。以上の結果から、M15 細胞と ES 細胞との cell-cell あるいは cell-matrix 相互作用が

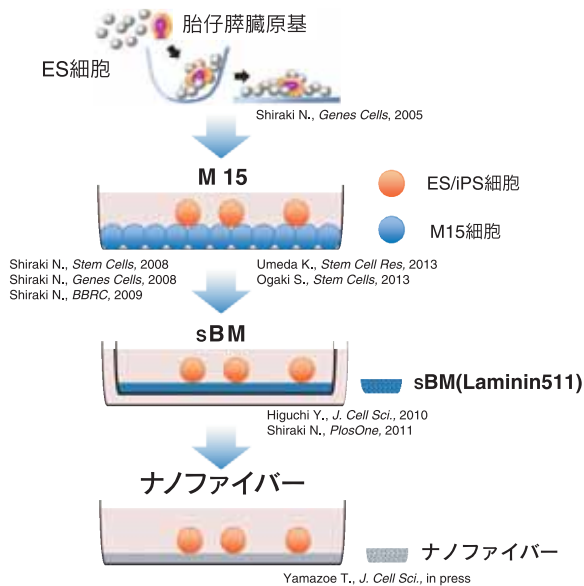


図4 分化誘導に用いた足場素材

臍臓分化には重要であることが示唆された。次に、マイクロアレイ解析にて細胞外マトリックス遺伝子の発現量を調べたところ、M15細胞は他の支持細胞であるPA6やOP9細胞と比べて、collagen type IVとラミニン $\alpha 5$ (*Lama5*)の発現が高いことが明らかになった。これらは基底膜の主成分であるが、なかでもラミニンは3つのサブユニットから構成されており、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖をそれぞれ一つずつ持つヘテロ三量体である。さらに、M15細胞において*Lama5*の発現をノックダウンすると、臍臓への誘導が抑制されることを確認した。

そこで、我々は国立環境研究所の持立克身博士らのグループが確立したラミニン10($\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$)を豊富に含む擬似基底膜 (synthesized basement membrane, sBM) に着目し、これを用いた新規臍臓分化誘導系の開発を試みた。M15細胞での知見を参考にして、内胚葉分化および臍臓分化における培養液組成を様々検討することにより、その結果、sBM上において支持細胞無しにES細胞は内胚葉から臍前駆細胞へと分化し、さらにインスリン産生細胞にまで分化することを明らかにした¹⁵⁾ (図4)。さらにsBMの臍臓分化誘導メカニズムを解析した結果、ラミニンのシグナルがインテグリンを介して伝達され、臍臓分化を誘導していることを見いだした。

続いて、sBMの臍臓分化誘導への適応を試みた。戦略はM15細胞の場合と同様で内胚葉分化誘導後の培地組成を臍臓分化に適化することで、臍臓誘導を試みた。検討の結果、sBM上でもマウスおよびヒトES細胞からアルブミンを分泌し、薬物代謝酵素活性を示す機能的な臍臓細胞の分化に成功した¹⁶⁾。さらに、sBMからの誘導メカニズムを解析した結果、基底膜成分であるラミニンのシグナルがインテグリンを介して伝達され、Akt (プロテインキナーゼB) のリン酸化を介して、臍臓分化を誘導していることを見いだした。

3-4. ナノファイバーを用いた分化誘導

再生医療にES/iPS細胞を応用するにあたり、培養系には未知の成分、とりわけ異種動物由来成分は可及的に排除されることが

望まれる。そこで次に注目したのは、完全な人工合成基材を用いる方法である。なかでもポリアミドをエレクトロスピニング法によってランダム配向したナノファイバーは、マウスES細胞の増殖促進や初代ラット肝細胞機能維持に適していると報告されていたことから、この基材をES/iPS細胞の臍臓分化に使用しうることから、この基材を支持細胞を使わずに無血清条件で内胚葉組織を分化誘導する際の培地組成については、sBMを用いた検討で多くの情報の蓄積があり、ナノファイバーを用いた分化誘導系の構築に大きく役立った。

検討の結果、ゼラチン、collagen type I、fibronectin、マトリゲルをコートした通常のプレートと比較して、ナノファイバーは効率よく内胚葉マーカーであるSox17の発現を増強し、ES/iPS細胞をアルブミン分泌能やICG取り込み能が良好な肝臓細胞に誘導した¹⁷⁾ (図4)。凹凸のあるナノファイバーの培養皿表面では、細胞はドーム上に丸く存在し*in vivo*と良く似た形態を示しており、我々は細胞骨格の制御に関わるRhoファミリーに属するRac1が、未分化状態のES細胞のみならず分化過程においてもナノファイバー上で活性化されていることを見出した。Rac1選択的阻害薬を用いた検討結果からRac1の活性化は初期の内胚葉誘導のみならず、内胚葉から肝臓への誘導においても重要な役割を担っていることを明らかにした。

4. 分化の可視化

分化誘導方法を構築するうえで、分化度の簡便な評価方法の有無は、構築に必要な研究期間に大きく影響する。また、ヒトES/iPS細胞は各種細胞に分化させることが可能だが、分化効率率は100%ではなく未分化な細胞がサンプル中に残ることとなる。そのため、癌化のリスクがある未分化な細胞を除去し、目的の細胞を選別するためにフローサイトメトリーが利用されている。そこで、我々は臍臓分化をリアルタイムでモニターし、かつ選別し解析する目的で、高効率な遺伝子相同組換え技術であるヘルパー依存型アデノウイルスを用いて、アルブミン (ALB) 遺伝子座に橙色蛍光タンパク質 (mKO1) 遺伝子を導入したヒトES細胞株およびiPS細胞株を樹立した¹⁸⁾。この細胞株由来の分化細胞では、mKO1の蛍光が内在のALB遺伝子の転写活性を反映するため、レポーターの蛍光を指標に、肝細胞を可視化、定量化、純化することが可能である。更にフローサイトメトリーで選別したmKO1陽性細胞と陰性細胞を、マイクロアレイ解析により比較したところ、mKO1陽性細胞において、薬物代謝など、肝機能と関連のある遺伝子群の発現が増加しており、mKO1陽性細胞が肝細胞の特性を有することが確認された。現在は、本細胞株を用いた臍臓分化誘導の更なる改善や、臍臓特異的に発現する新規マーカー遺伝子の探索を行っている。

通常、ES/iPS細胞から内胚葉組織である臍臓・肝臓・腸を分化誘導するためには、一か月を要し、作成するためには液性因子などコストもかかる。そこで、時間や費用を無駄にしないためには最終分化に至る過程で、分化誘導が成功しているかをチェックする必要がある。今後、再生医療にES/iPS細胞由来の分化細胞を利用するという場合はその分化誘導過程で品質チェックが徹底されるであろう。これまで分化度の確認は、指標となる細胞内タンパク質の発現量を一定期間ごとに測定し、それらの発現量の変化で判断するため一部の培養細胞を破壊する必要があった (図5 従来法)。そこで、我々は株式会社同仁化学研究所と共同で、培養上清中に分泌されたCerberus 1タンパク質を測定することで細

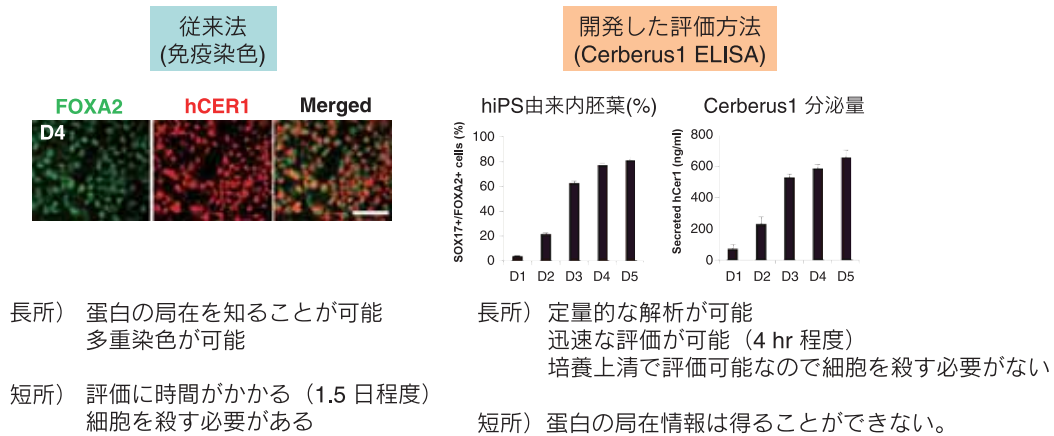


図5 Cerberus1 ELISA Kit と従来方法との比較

胞を破壊することなく内胚葉細胞の分化度を測定する方法を構築した¹⁹⁾ (図5 ELISA)。上述したES細胞由来内胚葉・外胚葉・中胚葉のマイクロアレイ結果から、内胚葉で特異的に発現が高い分泌因子を探索した結果、Cerberus1を見出した。マウスES細胞を内胚葉へ分化した場合、Cerberus1 mRNAの発現量は内胚葉マーカーであるSox17 (Sry-box containing gene 17) の発現と相関し、培養上清中に分泌されたCerberus1量も分化日数に比例して増加し、内胚葉の割合との相関が確認された。また、ヒトiPS細胞においても、培養上清中のCerberus1分泌量は内胚葉の細胞数と相関することが明らかとなった。本方法は、細胞内の蛋白の局在情報は得ることができないという短所はあるものの、評価時間が4時間と短いことや細胞を殺すことなく培養上清のみで定量的な評価が可能なのが従来法との大きな違いである。このELISA Kitを用いることで、iPS細胞を継続培養しながら内胚葉分化効率を簡便に測定することが可能となり、iPS細胞分化の品質管理への利用が期待される。

5. ES細胞分化から発生研究へ

ES細胞の研究では、発生研究で得られていた知見を利用することが多い。我々はES細胞分化誘導実験から得られた知見を発生研究へ応用するという研究も行ってきた。本章では、その例を2つ示す。

ES細胞から特定の細胞を分化誘導するためには、他の領域には発現せず、目的の領域のみに発現するマーカー遺伝子が非常に重要である。しかし、現実的には複数のマーカー遺伝子を組み合わせることで分化細胞を評価することが多い。そこで、我々は、これまで述べたES細胞分化誘導系とマイクロアレイを用いて、内胚葉に特異的に発現する遺伝子の探索を行った (図6A)。検討の結果、新規内胚葉マーカーとして細胞表面抗原であるDAF1 (CD55)を同定した²⁰⁾。さらに、既存のマーカー遺伝子であるCxcr4陰性のPdx1陽性細胞が存在する胎生9.5日目正常胚を用いた解析では、DAF1はすべてのPdx1陽性瞬前駆細胞で発現しており、瞬前駆内胚葉マーカーとしても有用であることが示唆された (図6B)。さらに、DAF1が細胞表面抗原である性質を利用して抗DAF1抗体を

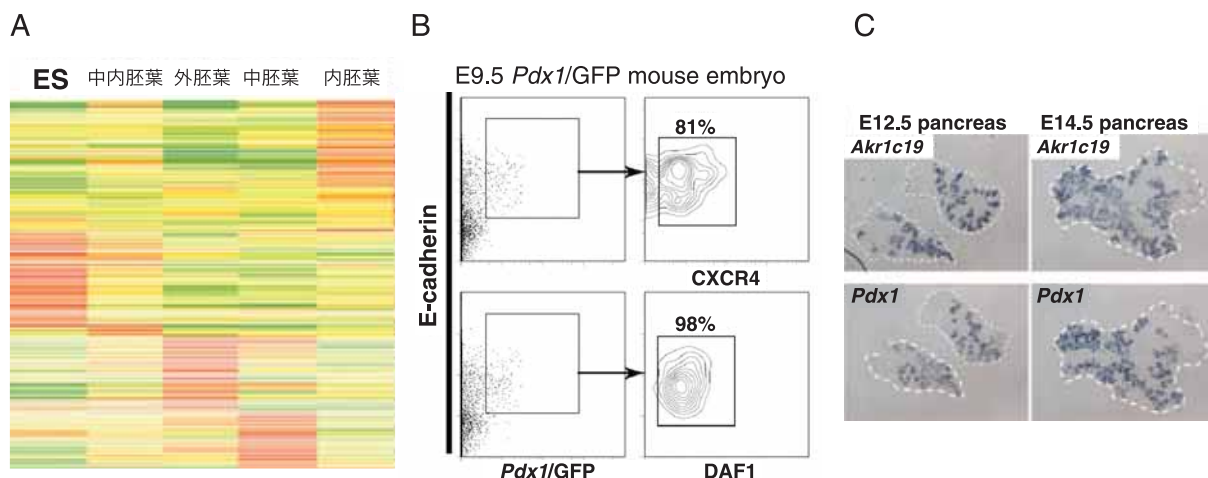


図6 ES細胞分化から得た知見の発生研究への応用

A) ES細胞由来各種細胞のマイクロアレイ解析 B) 胎生9.5日目におけるDAF1の発現 C) 胎生12.5および14.5日目胚の膵臓における*Akr1c19*の発現

利用した内胚葉細胞の濃縮が可能となり、内胚葉および膵臓研究のよいツールとして利用できる。現在は、この DAF1 陽性内胚葉の性質について詳細に検討を進めている。

我々は、上記のマイクロアレイ解析を更に進めて、膵臓特異的に発現する新規遺伝子の探索を行った。マイクロアレイ解析の結果から ES 細胞由来の内胚葉や膵臓前駆細胞で発現の高い遺伝子を 65 遺伝子抽出し、これらの遺伝子について胎生 8.5 日目の胚と胎生 14.5 日目の膵臓で *in situ* hybridization を行った。解析の結果 27 個の遺伝子について内胚葉もしくは膵臓での発現を同定した²¹⁾。さらに、この遺伝子中には 4 つの新規遺伝子 (*Akr1c19*, *Aebp2*, *Pbxip1*, *Creb3l1*) も含まれていた (図 6C)。現在は、それぞれの遺伝子について膵臓発生における役割を詳細に検討している。

6. 終わりに

本稿では、膵臓分化誘導についての現状について解説した。さらに、当研究室で構築した分化誘導系について足場および培養液の 2 つの観点から述べ、最後に分化誘導研究から得た知見の発生研究への応用について説明した。ES/iPS 細胞から作成した臓器を用いた再生医療を実現するためには、効率的な分化誘導方法の構築はもとより、Xenogenic Free な培養系の構築や治療に必要な細胞数の確保などの課題があり、目的細胞の純化も当然必要となるであろう。今後、上記問題が解決され、ES/iPS 細胞由来細胞が臨床応用されることを期待する。

[参考文献]

- M. Yasunaga, S. Tada, S. Torikai-Nishikawa, Y. Nakano, M. Okada, L. M. Jakt, S. Nishikawa, T. Chiba, T. Era and S. Nishikawa, *Nat. Biotechnol.*, **2005**, 23,1542-1550.
- K. A. D'Amour, A. D. Agulnick, S. Eliazar, O. G. Kelly, E. Kroon and E. E. Baetge, *Nat. Biotechnol.*, **2005**, 23, 1534-1541.
- K. A. D'Amour, A. G. Bang, S. Eliazar, O. G. Kelly, A. D. Agulnick, N. G. Smart, M. A. Moorman, E. Kroon, M. K. Carpenter and E. E. Baetge, *Nat. Biotechnol.*, **2006**, 24, 1392-1401.
- E. Kroon, L. A. Martinson, K. Kadoya, A. G. Bang, O. G. Kelly, S. Eliazar, H. Young, M. Richardson, N. G. Smart, J. Cunningham, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26, 443-452.
- R. Xie, L. J. Everett, H. W. Lim, N. A. Patel, J. Schug, E. Kroon, O. G. Kelly, A. Wang, K. A. D'Amour, A. J. Robins, *et al.*, *Cell stem cell*, **2013**, 12, 224-237.
- T. C. Schulz, H. Y. Young, A. D. Agulnick, M. J. Babin, E. E. Baetge, A. G. Bang, A. Bhoumik, I. Cepa, R. M. Cesario, C. Haakmeester, *et al.*, *PLoS One*, **2012**, 7, e37004.
- C. L. Basford, K. J. Prentice, A. B. Hardy, F. Sarangi, S. J. Micallef, X. Li, Q. Guo, A. G. Elefanty, E. G. Stanley, G. Keller, *et al.*, *Diabetologia*, **2012**, 55, 358-371.
- M. C. Nostro, F. Sarangi, S. Ogawa, A. Holtzinger, B. Corneo, X. Li, S. J. Micallef, I. H. Park, C. Basford, M. B. Wheeler, *et al.*, *Development*, **2011**, 138, 861-871.
- S. Chen, M. Borowiak, J. L. Fox, R. Maehr, K. Osafune, L. Davidow, K. Lam, L. F. Peng, S. L. Schreiber, L. L. Rubin, *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, 5, 258-265.
- N. Shiraki, C. J. Lai, Y. Hishikari and S. Kume, *Genes Cells*, **2005**, 10, 503-516.
- N. Shiraki, T. Yoshida, K. Araki, A. Umezawa, Y. Higuchi, H. Goto, K. Kume and S. Kume, *Stem Cells*, **2008**, 26, 874-885.
- N. Shiraki, K. Umeda, N. Sakashita, M. Takeya, K. Kume and S. Kume, *Genes Cells*, **2008**, 13, 731-746.
- S. Ogaki, N. Shiraki, K. Kume and S. Kume, *Stem Cells*, **2013**, 31, 1086-1096.
- N. Shiraki, Y. Higuchi, S. Harada, K. Umeda, T. Isagawa, H. Aburatani, K. Kume and S. Kume, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, 381, 694-699.
- Y. Higuchi, N. Shiraki, K. Yamane, Z. Qin, K. Mochitate, K. Araki, T. Senokuchi, K. Yamagata, M. Hara, K. Kume, *et al.*, *J. Cell Sci.*, **2010**, 123, 2733-2742.
- N. Shiraki, T. Yamazoe, Z. Qin, K. Ohgomori, K. Mochitate, K. Kume and S. Kume, *PLoS One*, **2011**, 6, e24228.
- T. Yamazoe, N. Shiraki, M. Toyoda, N. Kiyokawa, H. Okita, Y. Miyagawa, H. Akutsu, A. Umezawa, Y. Sasaki, K. Kume and S. Kume, *J. Cell Sci.*, in press
- K. Umeda, K. Suzuki, T. Yamazoe, N. Shiraki, Y. Higuchi, K. Tokieda, K. Kume, K. Mitani and S. Kume, *Stem. Cell Res.*, **2013**, 10, 179-194.
- H. Iwashita, N. Shiraki, D. Sakano, T. Ikegami, M. Shiga, K. Kume and S. Kume, *PLoS One*, **2013**, 8, e64291.
- N. Shiraki, S. Harada, S. Ogaki, K. Kume and S. Kume, *Cell Struct. Funct.*, **2010**, 35, 73-80.
- S. Ogaki, S. Harada, N. Shiraki, K. Kume and S. Kume, *BMC Dev. Biol.*, **2011**, 11, 13.

[著者プロフィール]

氏名：白木伸明 Shiraki Nobuaki

所属：熊本大学 発生医学研究所 幹細胞部門 多能性幹細胞分野 助教

連絡先：〒 860-0811 熊本県熊本市中央区本荘 2-2-1

TEL : 096-373-6806

E-mail : shiraki@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：熊本大学大学院医学研究科

学位：博士 (医学)

氏名：桑昭苑 Kume Shoen

所属：熊本大学 発生医学研究所 幹細胞部門 多能性幹細胞分野 教授

連絡先：〒 860-0811 熊本県熊本市中央区本荘 2-2-1

TEL : 096-373-6620

E-mail : skume@kumamoto-u.ac.jp

出身学校：大阪大学大学院理学系研究科

学位：博士 (理学)

新製品

内胚葉分化モニタリングキット

ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm

<特長>

- ・内胚葉への分化を特異的に検出できる
- ・細胞を損なわずに継続培養しながら分化状態をモニターすることができる
- ・短時間で多検体の測定が可能である

胚性幹細胞または多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) は、三胚葉 (内胚葉・中胚葉・外胚葉) を経由しあらゆる細胞に分化できるため再生医療の実現化に注目されています。三胚葉のなかでも内胚葉由来の細胞は、膵臓や肝臓といった人にとって重要な機能をもつ臓器へと分化する分岐点に位置するため、効率的な分化誘導、分化度の確認は不可欠です。分化度の確認には、指標となる mRNA や細胞内タンパク質の発現量を一定期間ごとに測定し、それらの発現量の変化で判断するため一部の培養細胞を破壊する必要があります。

本キットを用いて培養上清中のマーカータンパク質を検出することで、ES/iPS 細胞から分化した内胚葉細胞の分化度を測定することができます。このマーカータンパク質は内胚葉マーカーである Sox17、Foxa2 二重陽性細胞率と相関します。本キットでは培養上清中のマーカータンパク質を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法により検出するため、細胞を損なわず継続培養しながら分化の状態をモニターすることが可能です。また、多検体の測定に用いることができるため、分化誘導剤などの薬剤スクリーニングにも有用と考えられます。

本製品は熊本大学発生医学研究所との共同研究成果です。

<キット内容 :- Human Endoderm * >

- ・ Coated 96-well Strip Plate x 1
- ・ Standard x 1
- ・ Reagent A x 1
- ・ Reagent B x 1
- ・ Washing Buffer x 1
- ・ Storage Buffer 0.5 ml x 1
- ・ Substrate Solution 10 ml x 1
- ・ Plate Seal x 3

*- Mouse Endoderm は一部内容が異なります。

[参考文献]

- 1) H. Iwashita, N. Shiraki, D. Sakano, T. Ikegami, M. Shiga, K. Kume and S. Kume, *PLoS ONE.*, **2013**, 8 (5): e64291.

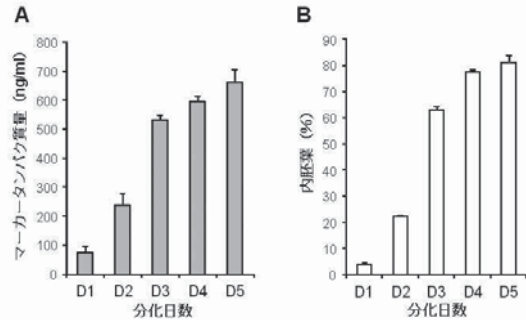


Fig. 1 ヒト iPS 細胞を用いた分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (A) と内胚葉細胞の割合 (Sox17, Foxa2 二重陽性細胞) (B) の関係 (A) 分化日数毎の培養上清中のマーカータンパク質量 (ng/ml) (B) 分化日数毎の内胚葉細胞の割合 (%)

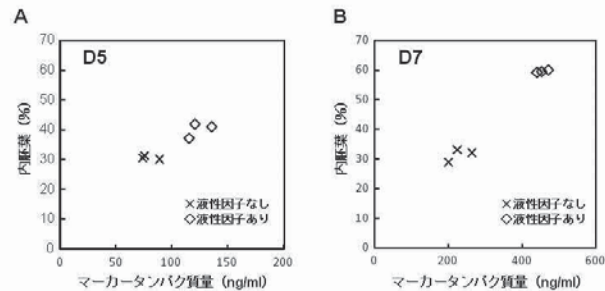


Fig. 2 マウス ES 細胞を用いた異なる培養条件下でのマーカータンパク質量と内胚葉細胞の割合 (Cxcr4, E-Cadherin 二重陽性細胞) の関係 (A) 分化 5 日目、(B) 分化 7 日目

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Human Endoderm	96 tests	95,000	ES01
ES/iPS Differentiation Monitoring Kit - Mouse Endoderm	96 tests	95,000	ES02

連載

**新しいナノ材料としての
カーボンナノチューブ
-最近の展開(バイオからエネルギーまで)
④**

中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦
九州大学大学院

1. カーボンナノチューブ (CNT) 透明フレキシブル導電性フィルム

1-1. 基本コンセプト

透明導電性フィルム (あるいは基板) はパソコン、携帯電話、スマートフォン、iPad などのフラットパネルディスプレイ用電極材料として欠かせない部材であり、市場規模が世界的に急拡大している。しかし、材料として希少金属であるインジウムを使った酸化インジウムスズ (Indium Tin Oxide: ITO) を用いているために、安定供給が危惧されている。透明導電性基板としてはタッチパネル用途として表面抵抗率 $500 \Omega \square^{-1}$ ・透過率 85% (@550 nm)、液晶パネル用途には、表面抵抗率 $100 \Omega \square^{-1}$ ・透過率 85% (@550 nm) という性能が必要であり、これを満たす ITO 代替材料の開発が急務となっている。また ITO 膜は、生産効率が悪いドライブロセスのスバツタ法で生産しているため、より生産効率が高いウエットコート方式での生産が望まれる。

高い電気伝導性と高いアスペクト比を持つ CNT を素材としたフレキシブル透明導電性フィルムは、ITO 代替として、実用化に極めて近い位置にいる。導電性高分子である Poly(3,4-ethylenedioxythiophene):Poly(styrenesulfonate) (PEDOT:PSS) や金属系の銀ナノワイヤーも代替材料の候補であるが、ここでは CNT に焦点を当てて解説する¹⁾。グラフェンを素材とする透明導電性膜の研究も活発であるが、これについては第 5 回にて紹介する。

透過率 (T) は表面抵抗率 (R_s) と膜厚 (d) が波長より十分に小さい範囲において、式 1 で関係づけられる。

$$T = \left(1 + \frac{188.5}{R_s} \frac{\sigma_{op}}{\sigma_{dc}} \right)^{-2} \dots \dots \dots (式 1)$$

(σ_{op} : 光学伝導度、 σ_{dc} : 直流伝導度)

通常、これらの値は波長 550 nm での値と比較される。 σ_{op} はドーピング状態には関係なく多くの場合 2×10^4 (S/m) とみなされることから、透過率と表面抵抗率は非常にシンプルな式で関係づけられていることが分かる。実験的にもこの式は実測値をよく再現できることが確かめられているが、パーコレーション閾値以下、すなわち CNT ネットワークの非常に疎な範囲で外れてくるので注意が必要である。

ここで R_s と σ_{dc} は d を介して

$$\sigma_{dc} R_s = 1/d \dots \dots \dots (式 2)$$

であるから、式 1 は

$$T = (1 + 188.5 \sigma_{op} d)^{-2} \dots \dots \dots (式 3)$$

と書き換えられ、フィルム膜厚 (塗布厚み) が薄いと透明性は向上する。ただし、CNT 塗布量を減少させると導電率は減少する。この二律背反を実現するには、塗布厚み分を補うほど σ_{dc} を大きくすればよい。SWNT-SWNT 間の接点は、接点抵抗として働くため、接点が多いほど σ_{dc} は小さくなる。導電性原子間力顕微鏡による実測では、SWNT-SWNT 間の抵抗は非常に大きく $k\Omega \sim M\Omega$ オーダーにも上る。CNT 一本の σ_{dc} は $200,000 \text{ S/cm}$ と非常に大きい、ネットワーク化し、導電パスに接点が存在すると、 5000 S/cm 程度まで大きく低下する。接点間の抵抗値は CNT のバンドルのサイズにも大きく依存し、 10 nm 程度のバンドルどうしでは $2.7 \text{ M}\Omega$ にもものぼり、孤立状態の SWNT 同士でも $98 \text{ k}\Omega$ もの抵抗が存在する。一方で、単独の CNT 内での抵抗は $\sim 10 \text{ k}\Omega \pm 6 \text{ k}\Omega / \mu\text{m}$ であり²⁾、 $2 \sim 4 \mu\text{m}$ の長さの CNT において、せいぜい $20 \sim 30 \text{ k}\Omega$ 程度であることが分かる。従ってネットワーク内の抵抗は接点抵抗が主であり、短い CNT を多数の接点でつないでネットワークを作るより、長い CNT で接点を最小限にしてネットワークを形成するのが望ましく、なおかつ構成する CNT は孤立分散した状態であることが理想的であることが理解できる。

パーコレーション理論より、アスペクト比の大きい CNT においては基板被覆密度が 1% に満たない範囲でパーコレーションが起こることが分かっている。パーコレーション閾値以上において σ_{dc} の値はネットワーク密度の $1 \sim 1.5$ 乗 (理論的には 1.33) で増加するため、透明導電性膜でターゲットとなる $90 \sim 95\%$ の透過率の範囲では (厚さ $5 \sim 10 \text{ nm}$ に対応) σ_{dc} の値が急激に増加する範囲に対応する。従って、ネットワーク構造の精密制御が透明導電性に大きく影響することが理解できる。理論的な σ_{dc} の最大値は $90,000 \text{ S/cm}$ と予想されているのに対し、報告されている最も大きい σ_{dc} でおよそ $13,000 \text{ S/cm}$ であり、まだ向上の余地がある。

1-2. 透明導電性フィルム作製法

ティップコーティング³⁾、Langmuir-Blodgett (LB) 法⁴⁾、電気泳動法⁵⁾、ろ過法、スピコーティング^{6,7)}、スプレー塗布^{8,9)}、パーコート塗布 (ロッドコーティング法)¹⁰⁾ などの様々な溶液塗布法からの CNT 薄膜の作製が可能になっている。このような溶液法による塗布は、高価な真空蒸着装置を必要とする ITO 基板と比較し安価な材料を提供する。いずれの場合も良い CNT 分散液を得るために、界面活性剤やポリマーのような分散剤が必要であるが、それらは接点部において大きな抵抗を引き起こすため、塗布後の除去プロセスが重要となる。ティップコーティング法は塗布する基板を CNT 分散溶液に浸して引き上げるだけの非常にシンプルな方法であるが、CNT は基板と分散剤との相互作用により吸着するために、分散剤の選択は重要である。この方法では引き上げ方向に CNT が配向した異方性薄膜も作製できる。しかし、両面に塗布されてしまうために、片面のみが必要であった場合、透明性の面で不利になってしまう。LB 法は、操作がシンプルでなく、汎用性は高くないが、高い異方性配向フィルムを得たい場合には有効な手法であろう。ティップコート法と同様に両面が塗布される方法である (片面コート法もある)。ろ過法は吸引濾過によりろ紙上に薄膜を作製する方法であり、ろ過量と溶液の濃度を制御することで厳密にネットワーク密度の調整ができ、可溶化剤の除去も可能であるのが特長である。均一な膜ができる反面、ろ紙を用いているために所望の基板への転写作業が必要な点と、大型化が困



図1 PETフィルム上のCNT透明導電性フィルム

難である欠点を有している。

スプレー塗布は高価な装置を必要とせず手軽な塗布法である。塗布後の蒸発過程において凝集が起こりやすいために、基板を加熱し溶媒の蒸発速度を早くするなど工夫することで溶液中での分散状態をそのまま固定化することができる。塗液は強制的に基板に塗膜されるためにディップコーティングのように基板と分散剤との積極的な相互作用の有無にかかわらず塗膜が可能である。膜厚は溶媒の濃度やスプレーの回数などで容易に制御が可能である。2007年に韓国成均館大学のLeeらは界面活性剤SDSに分散させたSWNTをスプレー塗布法によりPET基板上に薄膜を作製し、硝酸によるドーピング後およそ $100 \Omega \square^{-1}$ 、85%というITO並みの透明導電性を実現した⁹⁾。スプレー塗布の場合、細かい液滴の塗り重ねであるために、特にスプレー回数の少ない場合、液滴の塗布ムラの影響が大きく不均一になりやすい欠点がある。

大面積化を考慮に入れるとパーコート法は実用的で有望な技術である。この手法は、パーコーターと呼ばれる溝の入った棒で塗液を薄く引き伸ばす方法である。溝の深さやピッチの異なるパーコーターを用いることで膜厚を制御することができる。Pasqualiらのグループは界面活性剤の種類により変化するSWNT分散液の粘度に着目し、最適な透明導電性を与える界面活性剤の組み合わせを探索した。最適化により作製したSWNT薄膜を発煙硫酸でドーピングすることにより $300 \Omega \square^{-1}$ 、90%（または $100 \Omega \square^{-1}$ 、70%）という極めて高い導電性と透明性を実現している¹⁰⁾。

SWNTは確率統計的に3分の1が金属性SWNTであり、3分の2が半導体性SWNTである。接点部の抵抗の低減には半導体性SWNTへのドーピングによる金属化の他、金属性のみを分離して用いることも有効である。金属性SWNTは一本あたりの σ_{dc} が大きいように、金属性-金属性SWNT間の接触抵抗はその他の組み合わせ（金属性-半導体性等）より接触抵抗が小さいため、さらに大きな σ_{dc} の向上が見込める。近年のSWNT分離技術の進歩に伴い、高品質な金属性SWNTの入手が可能になり、金属性SWNTのみからなる透明導電性基板の作製が可能になった。実際に、未分離のSWNTから作製した基板が $1340 \Omega \square^{-1}$ だったのに対し、同じ透過率を持つ金属性SWNTのみからなる基板は $231 \Omega \square^{-1}$ と、明確な向上が得られている¹¹⁾。高い透明性と導電性フィルム作製には、より長い金属性SWNTの利用が好ましい。

最近、東レ(株)は、精密かつ均一な“ロールtoロール塗布加工”で、二層CNTを素材とする透明導電性フィルムの開発に成功している¹²⁾。このCNTフィルム(図1)は、PETフィルム基



図2 CNT透明導電性フィルムを素材とする電子ペーパー(デモ用)

材上に、CNT層、さらにその上部にオーバーコート層を設けたフィルムで、オーバーコート層は、CNT層の保護ならび光学的調整の役割を担っている。マイクロカプセル方式やツイストボール方式など種々の電子ペーパー方式に対応するため、全光線透過率90%、表面抵抗率 $500 \Omega / \square$ の標準品と、全光線透過率92%、表面抵抗率 $2500 \Omega / \square$ の高透過品2種類が開発されている。この素材を用いた電子ペーパー(デモ用)の写真を図2に示した。従来のITOフィルムと比較して以下の特長を有している。

- ①高透過、無色透明あり、カラー化での色再現性の向上に優位となる。
- ②緻密なネットワーク構造となっており、折り曲げ、引っ張り、衝撃に強い。
- ③オーバーコート層があり、耐擦過性、耐湿熱性に優れている。

溶液塗布法に対して、合成したCNTから直接塗膜する乾式プロセスもいくつか提唱されている。この場合、CNTは弱く絡み合った状態であるので分散状態の良い膜を作製でき、高い透明導電性が期待できる。また溶液調製のための超音波プロセスなどを経ないためにより簡便に製膜ができるのが長所である。中国精華大学のFanらは2002年に垂直配向MWNTアレイの端を引っ張るとMWNTが絡まって糸や薄膜が“紡ぎだされる”ことを発見し、ロールツーロール法でポリマーフィルム上へMWNT薄膜を固定化することに成功している¹³⁾。1枚の基板から実に60mもの長さ(幅8cm)のMWNT固定化シートを巻き取りが示されている。しかし、この技術で得られるMWNT薄膜の導電性は配向方向でも $1 \text{ k} \Omega \square^{-1}$ 、透明性は550nmで83%と不十分であった¹⁴⁾。

SWNT合成反応炉からフィルター上にSWNTの吹き付けを行い、得られたSWNT薄膜を所望の基板に転写するユニークな技術も提案されている¹⁵⁾。前述のMWNT配向成長基板からの配向薄膜と異なり得られるSWNT薄膜はランダムネットワークを形成していることが特徴である。得られたCNT薄膜は $110 \Omega \square^{-1}$ 、90%という高い透明導電性を示し、さらに有機ELの電極として動作させることに成功している。マスクを使うことでパターンングも可能で素子化にも適していることから、ロールツーロール法と組み合わせで低コストで実用化できる可能性がある。これらの乾式プロセスは溶液塗布法のようにあらかじめ分離精製したSWNT等を用いることはできないが、プロセスの簡便さは大きな利点である。

1-3. ドーピングによる導電性向上

塗布後のCNT薄膜の導電性を向上させる方法としてドーピングによるキャリアの注入が有効である。ドーピングには共有結合的な手法と非共有結合的な手法がある。CNT表面への官能基導入などによる共有結合的ドーピングは非常に安定である反面、CNTに欠陥を導入することになるという欠点がある。分子吸着やCNTバンドル間へのインターカレーションによる非共有結合的ドーピングはキャリアの移動度への影響はほとんどないもののドーパントの脱離により、向上した導電性は元に戻ってしまい、不安定である。最もよく行われる硝酸ドーピングはSWNT薄膜塗布基板を3M程度の硝酸水溶液に含浸するだけの非常にシンプルな方法である。硝酸水溶液の濃度、膜厚、浸漬条件によっても異なるが例えば表面抵抗率を半分程度まで下げた報告がある¹⁶⁾。また臭素、塩化チオニル、塩化金酸、F₄TCNQ、ヒドラジンなどもドーパントとして用いられている。我々は、自立型のCNT透明導電性フィルムを開発した(図3)。素材は、ミクロンに及ぶ長いCNTを用いて、スプレー法でガラス基板上で作製し、水に浸すとガラスから剥離し、水面に透明フィルムが得られる。これをPETに転写出来る。このフィルムの導電性は、硝酸ドーピングにより、120 Ω/□ (透過率90%)という高性能を示す¹⁷⁾。

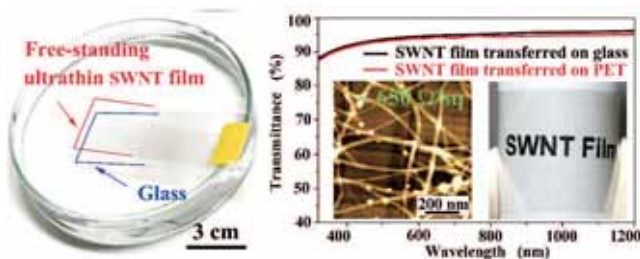


図3 長い単層CNTから形成された自立型透明導電性フィルム (右上は、そのAFM写真とPET上のフィルムの写真)

1-4. フレキシブルフィルムとしてのCNT薄膜

CNTの特長として、しなやかさと堅牢さを兼ね備えている点が挙げられる。そのためCNTを用いた透明導電性フィルムは高い曲げ安定性を有している。ITO基板は曲率半径13mm付近で表面抵抗が急激に上昇するのに対し、CNTフィルムの場合、実に曲率半径2mmまで表面抵抗の変化がないことが明らかにされている¹⁸⁾。走査型電子顕微鏡(SEM)観察によりITO基板には曲げ試験後に多くのクラックが生じ、物理的な破壊が導電性を低下させる。これが、ITOが金属であることに起因しており、克服は困難である。これに対して、CNTはポリマーとしての特長を有している。CNTフィルムではCNTネットワーク構造がストレスを緩和し、変形に対して強いと考えられる。繰り返し曲げ試験においても極めて高い再現性が報告されている^{17,19)}。また引っ張り試験においては、ポリエチレンテレフタレート(PET)上に塗布したITOにおいては2%の引っ張りにおいて抵抗の急激な上昇がみられたのに対し、CNT薄膜塗布PET基板においては18%の引っ張りでもわずか14%の抵抗変化しか見られなかった²⁰⁾。さらには摩擦試験においてもCNT薄膜基板においては10000回以上の摩擦試験において変化が見られなかったのに対し、ITOにおいては摩擦開始から抵抗の上昇がみられた。フレキシブルで伸縮可能なCNT

透明電極フィルムは、ウェアラブルディスプレイや携帯電子書籍など、ITOでは不可能であった新しい用途に応えるポテンシャルを十分に有している。

[参考文献]

- 1) 中嶋直敏、藤ヶ谷剛彦、「カーボンナノチューブ、グラフェン」、高分子ワンポイント、共立出版、**2012**, pp.69-90.
- 2) S. Li, Z. Yu, C. Rutherglen and P. J. Burke, *Nano Lett.*, **2004**, *4*, 2003-2007.
- 3) N. Saran, K. Parikh, D.-S. Suh, E. Munoz, H. Kolla and S. K. Manohar, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4462-4463.
- 4) V. Krstic, G. S. Duesberg, J. Muster, M. Burghard and S. Roth, *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 2338-2340.
- 5) P. V. Kamat, K. G. Thomas, S. Barazzouk, G. Girishkumar, K. Vinodgopal and D. Meisel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10757-10762.
- 6) M. C. LeMieux, M. Roberts, S. Barman, Y. W. Jin, J. M. Kim and Z. N. Bao, *Science*, **2008**, *321*, 101-104.
- 7) M. A. Meitl, Y. X. Zhou, A. Gaur, S. Jeon, M. L. Usrey, M. S. Strano and J. A. Rogers, *Nano Lett.*, **2004**, *4*, 1643-1647.
- 8) Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J. M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J. R. Reynolds, D. B. Tanner, A. F. Hebard and A. G. Rinzler, *Science*, **2004**, *305*, 1273-1277.
- 9) H.-Z. Geng, K. K. Kim, K. P. So, Y. S. Lee, Y. Chang and Y. H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7758-7759.
- 10) B. Dan, G. C. Irvin and M. Pasquali, *ACS Nano*, **2009**, *3*, 835-843.
- 11) A. A. Green and M. C. Hersam, *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 1417.
- 12) a) 渡邊 修, プラスチックエージ, **2012**, *58*, 61-63, b) 渡邊 修, 琴浦正晃, 月刊ディスプレイ, **2013**, *19*, 63-67.
- 13) K. Jiang, Q. Li and S. Fan, *Nature*, **2002**, *419*, 801.
- 14) F. Chen, L. Kai, W. Jie-Sheng, L. Liang, C. Jia-Shyong, Z. Yuying, S. Yinghui, L. Qunqing, F. Shoushan and J. Kaili, *Adv. Funct. Mater.*, **2010**, *20*, 885-891.
- 15) A. Kaskela, A. G. Nasibulin, M. Y. Timmermans, B. Aitchison, A. Papadimitratos, Y. Tian, Z. Zhu, H. Jiang, D. P. Brown, A. Zakhidov and E. I. Kauppinen, *Nano Lett.*, **2010**, *10*, 4349-4355.
- 16) H.-Z. Geng, K. K. Kim, K. P. So, Y. S. Lee, Y. Chang and Y. H. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7758-7759.
- 17) Q. Liu, T. Fujigaya, H.-M. Cheng and N. Nakashima, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 16581-16586.
- 18) L. Hu, D. S. Hecht and G. Gruner, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 5790-5844.
- 19) E. C. W. Ou, L. Hu, G. C. R. Raymond, O. K. Soo, J. Pan, Z. Zheng, Y. Park, D. Hecht, G. Irvin, P. Drzaic and G. Gruner, *ACS Nano*, **2009**, *3*, 2258-2264.
- 20) C. M. Trottier, P. Glatkowski, P. Wallis and J. Luo, *J. Soc. Inf. Disp.*, **2005**, *13*, 759-763.

Topics on Chemistry

レドックス応答性タンパク質チオール解析用試薬 DNA マレイミド

株式会社同仁化学研究所 加治屋 いづみ、大内 雄也

生体は内外の環境変化に迅速に応答し、その恒常性の維持を図っている。その中でもエネルギー代謝や免疫応答の過程で発生する活性酸素は、生体が受ける最も大きなストレスであり、疾病や老化の大きな要因の一つとして広く認知されている。近年では、このような酸化ストレスの障害性という負の面だけではなく、重要なシグナル伝達機能としての役割が明らかとなり、酸化および還元反応を利用した細胞機能制御は新たな研究ステージに入ってきている。その中心にあるのが、タンパク質に存在するシステインである。システインのチオール基は生体内のレドックス変化に応答するセンサー部位であり、過酸化、ニトロシル化、スルフィドリル化、グルタチオン化などの様々な化学的修飾を受けることで転写やタンパク質発現、細胞死などの様々な細胞応答を引き起こすことがわかってきている。従って、タンパク質内のチオール基修飾の解析は、レドックスシグナルを理解する上で必要不可欠であり、近年のプロテオミクス技術の発展に伴う網羅的なタンパク質解析と平行して、特定タンパク質のシステインチオール基の詳細な解析が進められている。

今回のトピックでは、特定タンパク質内のチオール基が修飾を受けているのかどうか、修飾を受けているチオール基はいくつあるのかを簡便に解析できる手法について紹介したい。

電気泳動によるタンパク質分離やウェスタンブロットによるタンパク質解析は、古くから使用されている汎用的な手法であり、現在でもタンパク質を用いた実験には欠かせない技術のひとつである。これらの手法を用いて反応性チオール基の解析を行う場合、何らかの化合物でチオール基をラベル化し、ラベル化による変化を追跡することでその情報を得ることができる。最も一般的な方法である蛍光標識法の場合には、タンパク質に反応性チオール基が存在すれば、その量に応じてタンパク質に蛍光化合物を導入することができるので、タンパク質に付加される蛍光シグナルによって反応性チオール基の有無あるいは量的情報を得ることができる。しかし、多くのレドックス応答性タンパク質のようにタンパク質内に複数の反応性チオール基が存在する場合には、蛍光強度の比較だけではその解釈は困難である。すなわち、タンパク質全体量に対する反応性チオール基の平均的な量をモニターすることはできるが、チオール基の状態変化に関する情報は得ることができない。特にレドックス応答性タンパク質の場合には、反応性チオール基の平均量ではなく、個々のチオール基の状態変化が重要な情報となるため、蛍光標識法ではなく分子量変化による解析法がより有効な手段となる。つまり、反応性チオール基を適当な化合物で標識し、SDS-PAGE によってタンパク質を分離することで、反応性チオール基の数に応じて分子量の変化をモニターし、バンドシフトの形で反応性チオール基の分布情報を得ることが

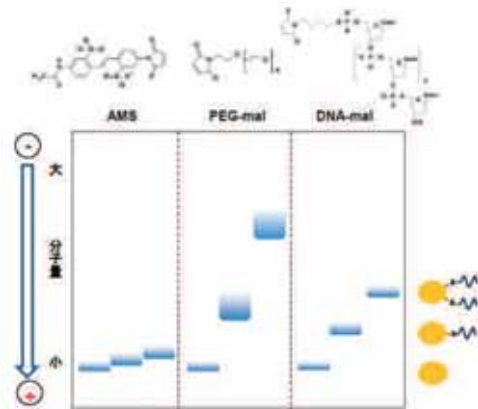


Fig. 2 マレイミド化合物を用いたタンパク質チオールの電気泳動解析

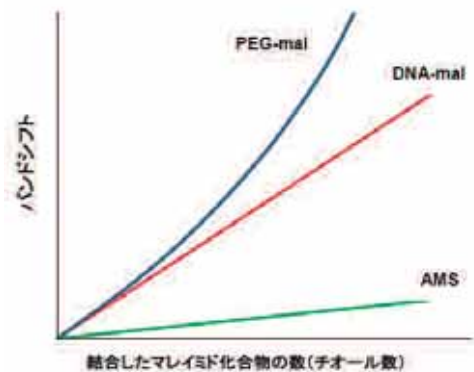


Fig. 3 結合したマレイミド化合物数とバンドシフトの関係

きる。

AMS (4-Acetamido-4-maleimidylstilbene-2,2-disulfonic acid) やマレイミド化ポリエチレングリコール (PEG-mal) は、本目的に使用されるチオール標識試薬であり、レドックス応答性タンパク質を解析する上で欠かせない存在となっている。しかしながら、AMS は分子量が小さいため、電気泳動時のバンドシフトが小さく、大きなタンパク質には適用できないという欠点がある。一方、PEG-mal は分子量が大きいため、標識によるバンドシフトが大きく、様々なタンパク質への適用が可能である。しかし、PEG-mal 自体に分子量分布が存在するため標識したタンパク質のバンドがブロードであり、PEG で標識されたタンパク質の電気泳動度の変化は分子量に比例しないため、バンドシフトからチオール基数の情報を得られないという欠点がある (Fig. 2, 3)。

そこで、原、久堀らはこれらの問題を解決しようとする新規のマレイミド化合物 DNA-maleimide (DNA-mal) を開発した。この化合物は、一本鎖 DNA の末端にマレイミド基を導入した単純な構造だが、合成する DNA の分子量が単一であるため標識されたタンパク質のバンドが非常に明瞭であり、標識によるタンパク質泳動の変化がチオール基数に比例するという特長を有している (Fig. 2, 3)。今回使用されてい

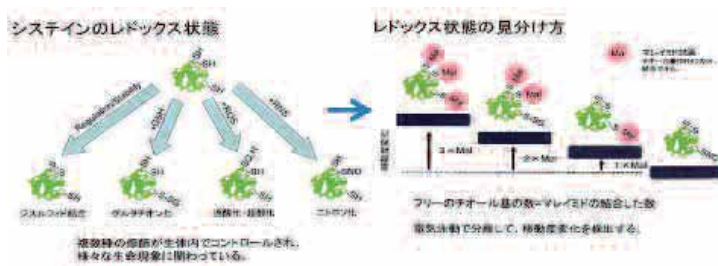


Fig. 1 マレイミド化合物を用いたタンパク質チオールの電気泳動解析の概略

る DNA は、塩基数が 24 であり、電気泳動上ではチオール基 1 個あたり約 9 kDa のバンドシフトを示す。また少なくとも 6 つの反応性チオール基を有するタンパク質までは、チオール基数に比例したバンドシフトを示すことがわかっている。さらに、種々の異なる電気泳動条件下でラベル化タンパク質を泳動した場合、PEG-mal は泳動条件によってバンドシフトが変動するのに対し、DNA-mal は泳動条件に関係なく分子量変化に応じたバンドシフトを示すことが確認されている。従って、バンドシフト量の測定によって、タンパク質分子 1 個あたりの反応性チオール基の数を直接求めることが出来る。

タンパク質のシステインチオール基の翻訳後修飾は、単なる酸化ストレス応答に限らず、種々のシグナル伝達系に参与しており、その反応の多様性や、感受性の高さからセリンやチロシンのリン酸化以上に重要なシグナルである可能性が示唆されている。また、最近注目されている反応性硫黄分子の関与も確認されており、今後システインチオールを含む硫黄を中心とした生理機能の解明が大きな研究の流れを作り出すものと予想される。

今回紹介した DNA-mal を用いた解析法は、タンパク質内のシステインチオール基がどの程度修飾を受けているかを簡便に解析できる有用な技術であり、またピオチンスイッチ法などで用いられている修飾チオールへの選択的ラベル化法と組み合わせることにより、タンパク質がどのような修飾を受けているか、そしてそれはどの程度なのかなど、より詳細なチオール解析への応用も可能である。今後、本手法がタンパク質チオール解析法として実用化され、硫黄を中心とした生体内シグナル伝達解明の一翼を担うことを期待したい。

[参考文献]

S. Hara, T. Nojima, K. Seio, M. Yoshida and T. Hisabori, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2013**, 1830, 3077.

お知らせ

日経バイオテク ONLINE は国内唯一のバイオポータルサイトとして、多くの国内バイオ研究者から閲覧されております。
<https://bio.nikkeibp.co.jp/>

すでに多くの方がご覧になられたことがあるかと思えます。様々な情報が日々発信されておりますが、同仁化学研究所も「学会・セミナー」「製品・サービス」のご案内を投稿しております。

新製品のご案内や各製品のトピックス、開発中の製品などを随時ご紹介しております。

より多くの研究者にご覧いただく機会を得たことで、国内研究者の研究ツールの一つとなれるものを提供できればと考えております。

今後も様々なツールから皆様に情報を発信してまいります。是非ご覧ください。

パンフレットのご案内

はじめてシリーズ 2
 「はじめての抗体標識プロトコル」

小社カスタマーリレーション部では小社に頂くお問合せを基にプロトコル「はじめてシリーズ」を作成しております。

この度、第二弾として「はじめての抗体標識プロトコル」を作成いたしました。直接標識法の利点や実施例などを解りやすくまとめた、はじめて抗体を標識される方向けのプロトコルです。

第一弾の「はじめての細胞内 Ca²⁺ 測定プロトコル」と共に是非一度ご覧下さい。

抗体を用いた検出法（イムノアッセイ）は特異性が高く、応用範囲が広いことから様々な研究で汎用されています。抗原に特異的な抗体（一次抗体）を抗原と結合した後、標識二次抗体（抗体を認識する抗体）で検出する方法（間接法）が一般的に利用されますが、必ずしも全ての研究で適用できるわけではありません。

一次抗体を直接、酵素やピオチン、蛍光色素等で標識することができれば、実験手順が簡略化されるのはもちろんのこと、多重染色の可能性の広がり、二次抗体の影響の排除など多くの利点があります。それにもかかわらず、一次抗体への直接標識法が浸透しない背景には、標識操作の煩雑さや得られる標識体の活性低下といった問題点があります。

小社では抗体への直接標識に適した Labeling Kit 類を販売しており、その利点や使用方法も記載しています。本プロトコルや Labeling Kit 類などの関連製品を是非ご研究にご活用下さい。

各資料のご請求は小社マーケティング部までご連絡下さい。
 フリーダイヤル：0120-489548
 e-mail: info@dojindo.co.jp

はじめての抗体標識プロトコル目次

- I. はじめに
- II. イムノアッセイの各手法の利点と欠点
- III. 何を標識するのか
- IV. 抗体のどこを標識するのか
- V. どのようにして標識するのか
- VI. どのようにして検出するのか
- VII. フィルトレーションチューブを利用した反応・精製
- VIII. 抗体へのピオチン標識方法
- IX. 抗体への酵素標識方法
- X. 抗体への蛍光色素標識方法
- XI. 抗体への蛍光タンパク質標識方法
- XII. Fab' へのアルカリホスファターゼ標識方法
- XIII. 関連技術紹介
- XIV. 関連製品
- XV. 参考文献



開発中

硫化水素研究用試薬およびキット

近年、毒ガスとして知られている硫化水素 (H₂S) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く第3のガス状シグナル分子として注目されています。

生体内に存在する硫化水素は、主にL-システインを基質としてシスタチオンβ-シターゼ (CBS) やシスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ (3-MST) などの酵素類によって産生され、生理活性を示すと共に、システイン側鎖のSH基に付加した結合型硫黄として生体内に貯蔵されると考えられています。硫化水素は、NOやCOと同様にガス状分子として認知されていますが、そのpK_aは約7であり、生理的pHでは約80%が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在します。また、硫化水素イオンは生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細は未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれています (概略に関しては、ドージンニュース 146号「生理活性物質としての硫化水素」をご参照ください)。

小社では現在、このような研究背景の中、硫化水素研究に有用な試薬およびキットの開発を行っております。ご興味、ご要望などありましたら、お気軽に小社までお問合せ下さい。

硫化水素イオン比色定量用キット(メチレンブルー法)

<特長>

- ・比色法により硫化水素を定量することができる
- ・マイクロプレートを用いた多検体測定が可能
- ・酸に不安定な結合型硫黄の影響を受けない

メチレンブルー法は、最も一般的な硫化水素イオン定量法の一つです。本手法は、酸性条件、塩化鉄(III)存在下でN,N-dimethyl-p-phenylenediammoniumと硫化水素が反応してメチレンブルーを生成する機構に基づいており、生成したメチレンブルー由来の650 nm付近の吸光度から硫化水素を定量することができます¹⁾。ただし、本手法は酸性条件下で反応を行うため、生体試料に含まれる酸に不安定な結合型硫黄由来の硫化水素の反応への関与が示唆されており、実際の生体内硫化水素の絶対定量には適していないと考えられています。そこで小社では、このような結合型硫黄の影響を受けず、遊離の硫化水素イオンを特異的に検出できるキットの開発を行っております。

【キット内容】

- ・ Na₂S Standard × 1
- ・ 1% Zinc Acetate × 1
- ・ DPDA × 2
- ・ FeCl₃ Solution × 1

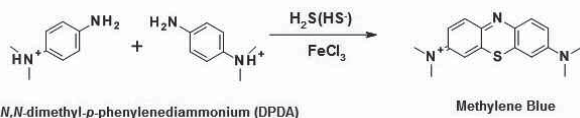


Fig. 1 硫化水素によるメチレンブルー生成反応

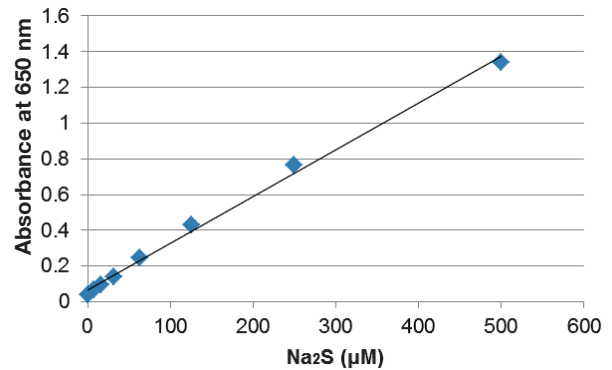


Fig. 2 硫化ナトリウムを用いた検量線例 (プレートリーダー 650 nm フィルター使用)

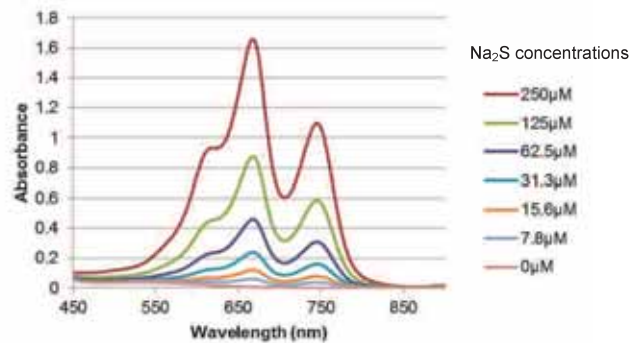


Fig. 3 硫化ナトリウム濃度に依存したメチレンブルー由来の吸光スペクトル変化

硫化水素 HPLC 検出用キット (monobromobimane 法)

<特長>

- ・ monobromobimane を用いた高感度 HPLC 検出が可能
- ・ 標準物質である Sulfide-dibimane を付属

Monobromobimane を用いた HPLC 分析法は、最も高感度で汎用性の高い硫化水素検出法として利用されています。Monobromobimane は、チオール特異的蛍光ラベル化剤であり、硫化水素 1 分子に対し、Bimane 2 分子が標識された特異的な化合物 (Sulfide-dibimane) を生成します。そのため、グルタチオンやシステインなどの他のチオール基を有する物質との分離が可能であり、また生成した化合物が蛍光を有するため、蛍光検出による高感度分析ができます³⁻⁵⁾。また、最近では質量分析装置と併用することでさらに高感度化と高選択性を達成した方法が報告され、硫化水素だけではなく、SH 基を有する種々の生体物質の詳細な解析法として確立されつつあります^{2,6)}。

本キットには、反応に必要な試薬類および標準物質である Sulfide-dibimane が含まれています。

【キット内容】

- ・ Monobromobimane × 3
- ・ Reaction buffer × 1
- ・ Sulfide dibimane × 1

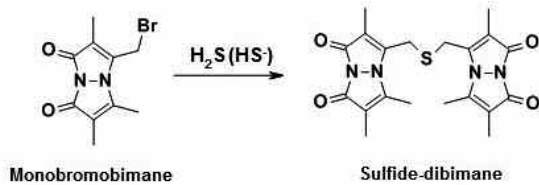
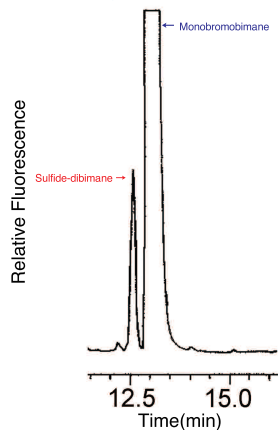


Fig. 4 Monobromobimane と硫化水素の反応



<HPLC 条件例>

System : Shimadzu LC-10A
 Column : Inertsil ODS-3 (3 μ m, 150 \times 4.6 mm I.D.)
 Solvent : A: 0.1% TFA/H₂O, B: 0.1% TFA/Acetonitrile
 Time (min) Gradient
 0 A/B = 85/15
 5 A/B = 65/35
 16 A/B = 45/55
 23 A/B = 30/70
 Flow Rate : 1 ml/min
 Column Temp : 40°C
 Detection : Fluorescence 475 nm (Excitation 390 nm)
 Injection : 5 μ l

Fig. 5 HPLC チャート例

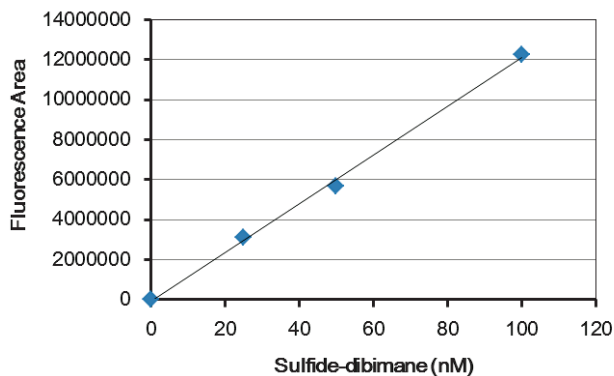


Fig. 6 Sulfide-dibimane 標準液を用いた検量線の例

【参考文献】

- 1) N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, *Talanta*, **2000**, 52, 771.
- 2) T. Morikawa, M. Kijimura, T. Nakamura, T. Hishiki, T. Nakanishi, Y. Yukutake, Y. Nagahata, M. Isikawa, K. Hattori, T. Takenouchi, T. Takahashi, I. Ishii, K. Matsubara, Y. Kabe, S. Uchiyama, E. Nagata, M. M. Gadalla, S. H. Snyder and M. Suematsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 1293.
- 3) G. L. Newton, R. Dorian and R. C. Fahey, *Anal. Biochem.*, **1981**, 114, 383.
- 4) E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. VandenEkart, C. F. Toombs and C. Szabo, *Br. J. Pharmacology*, **2010**, 160, 941.
- 5) X. Shen, C. B. Pattillo, S. Pardue, S. C. Bir, R. Wang and C. G. Kevil, *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, 50, 1021.
- 6) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Inoue, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, Albert van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, 8, 714.

販売中止予定のお知らせ

平素は、同仁化学研究所製品をご使用いただき誠にありがとうございます。

2014年2月1日より、下記製品の販売を中止いたします。在庫につきましては、小社マーケティング部までお問い合わせください。

販売中止品

同仁コード	コード番号	品名
A033	343-00082	Al(III)-AA
I004	341-05561	Indo 1
F287	—	N-Fmoc-Aminoundecanethiol
F288	—	N-Fmoc-Aminooctanethiol
F289	—	N-Fmoc-Aminohexanethiol

包装容量削減品

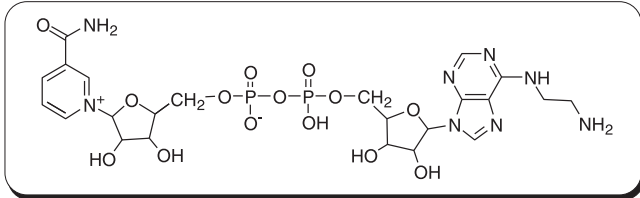
同仁コード	コード番号	品名	削減容量	代替容量
B003	345-00184	Bathophenanthroline	5 g	→ 1 g
D465	345-07323	DTCS Na	500 mg	→ 100 mg

Request に変更

同仁コード	コード番号	品名	容量
B363	—	TAZ-01	1 g

試作品

N⁶-2AE-NAD



NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) は生体内で様々な脱水素酵素 (デヒドロゲナーゼ) の補酵素として重要な働きをしています。例えば、乳酸脱水素酵素 (LDH) による乳酸のピルビン酸への変換や、アルコール脱水素酵素 (ADH) によるエタノールのアセトアルデヒドへの変換において電子の授受に関わっています (Fig. 1)。

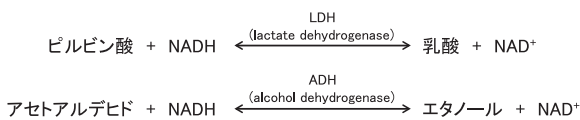


Fig. 1 生体内の様々なデヒドロゲナーゼと NAD の酸化還元反応

小社では現在、反応性基を導入した補酵素の開発を進めており、N⁶-2AE-NAD は NAD のアデニンの N⁶ 位にアミノエチル基を導入した誘導体です。末端のアミノ基を介して電極やタンパク質などに共有結合で固定化することが可能です。酵素による NAD⁺ の NADH への還元率を 100 としたときに、N⁶-2AE-NAD は、80 ほどの還元率を保持していることが報告されています^{1, 2, 3)}。

このような性質を生かして、N⁶-2AE-NAD はバイオセンサに 응용されています。Kharitonov らは SiO₂ や金基板上へ NAD を共有結合で固定化し、Field-Effect Transistor (FET) ベースの乳酸検出酵素センサを作製しています (Fig. 2)⁴⁾。

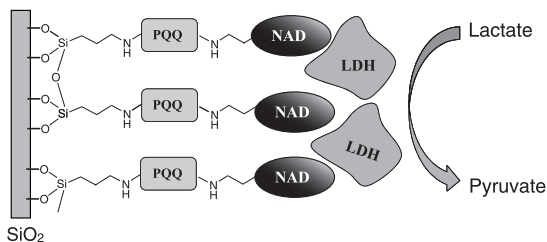


Fig. 2 NAD を固定化した乳酸検出用の酵素センサの模式図⁴⁾

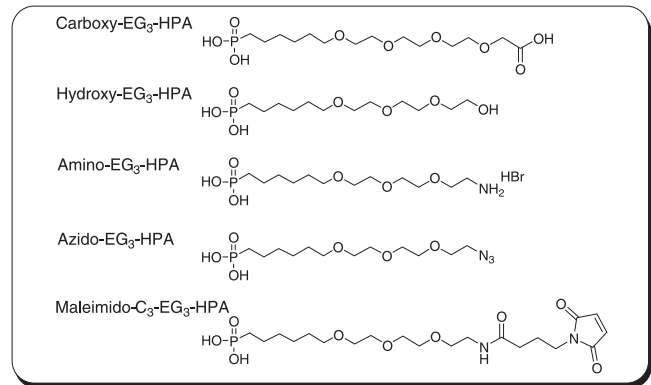
N⁶-2AE-NAD にご興味のある方は、小社までお問合せ下さい。

[参考文献]

- 1) H. L. Schmidt, G. Grenner, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 67, 295.
- 2) M. Muramatsu, I. Urabe, Y. Yamada, H. Okada, *Eur. J. Biochem.* **1977**, 80, 111.
- 3) J. Hendle, A. F. Buckmann, W. Aehle, D. Schomburg, R. D. Schmid, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 213, 947.
- 4) A. B. Kharitonov, M. Zayats, L. Alfonta, E. Katz, I. Willner, *Sens. Actuators B*, **2001**, 76, 203.

試作品

バイオセンサ向けホスホン酸誘導体



ホスホン酸誘導体は Al₂O₃ や TiO₂、ITO などの金属酸化物上に結合して自己組織化単分子膜 (SAM) を形成することから、有機デバイスやバイオセンサなど様々な用途で応用され始めています。金属酸化物の表面処理に古くから用いられているシランカップリング剤と比べ、ホスホン酸誘導体は「試薬が安定」「形成される SAM が高密度」「形成される SAM が安定」といった利点を有しています。バイオセンサに関しては、金基板上のアルカンチオール SAM が良く利用されています。バイオセンサでは非特異結合を抑制することが非常に重要なことから、アルカンチオール SAM では非特異結合抑制効果の高いオリゴエチレングリコール含有アルカンチオールが汎用されています。Al₂O₃ や TiO₂、ITO を基板として用いるバイオセンサにおいてもオリゴエチレングリコールを含有したホスホン酸 SAM が有用であると考えられます。

そこで、小社ではオリゴエチレングリコールを含有し、末端にカルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、アジド基、マレイミド基を有するホスホン酸誘導体を試作致しました。

< Biotin PA-SAM Formation Reagent >

また、小社ではアルカンチオール SAM の One Shot タイプとして Biotin-SAM Formation Reagent (品コード: B564) を販売しております。このホスホン酸タイプである Biotin PA-SAM Formation Reagent も試作致しました。

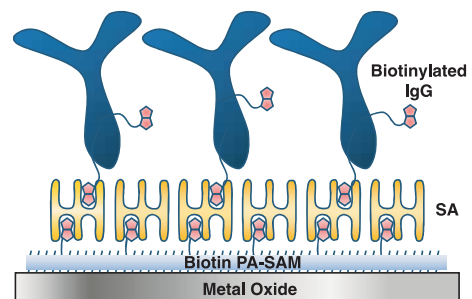
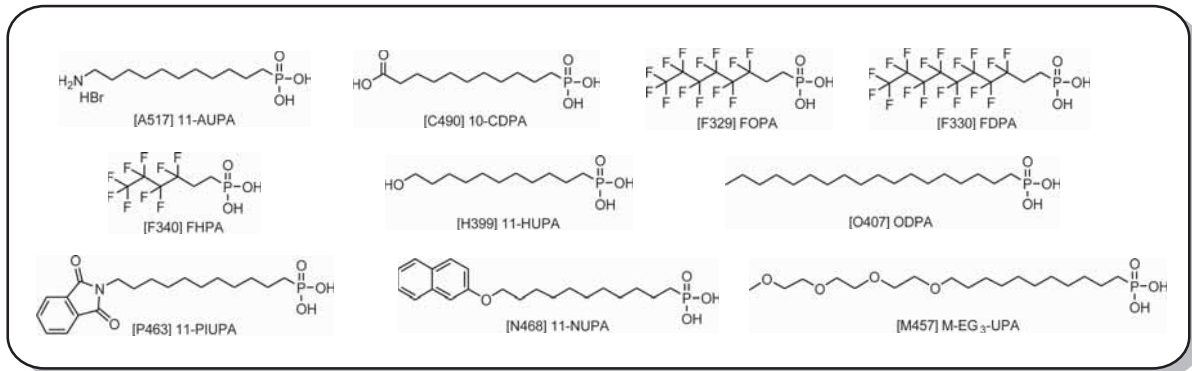


Fig. 3 Biotin PA-SAM Formation Reagent とストレプトアビジン (SA) を用いて作製した抗体固定化センサの模式図

上記バイオセンサ向けホスホン酸誘導体にご興味のある方は小社までお問合せ下さい。

新製品

金属酸化物表面処理用ホスホン酸誘導体



<特長>

有機シラン（シランカップリング剤）に比べ、

- ・ 試薬の安定性が高い
- ・ 高密度な SAM が形成される
- ・ 安定な SAM が形成される

ホスホン酸誘導体は、Al₂O₃、TiO₂、ZrO₂、シリコン酸化膜 (SiO₂)、マイカ、ステンレス (SS316L)、ニチノール、ヒドロキシアパタイト、ZnO、ITO 等の種々金属酸化物の表面処理・改質剤として、近年、注目されています。

金属酸化物の表面処理には古くから有機シラン系の自己組織化単分子膜 (SAM) が用いられていますが、安定性が低く、試薬同士の重合が起こるなど必ずしも使い易いものではありませんでした。ホスホン酸誘導体はそれ自身は非常に安定な化合物であるにもかかわらず、有機シラン同様に金属酸化物表面に SAM を形成します。また、ホスホン酸誘導体は有機シランに比べ、密度が高く安定な SAM を形成すると報告されています。

Schwartz らは、Ti 酸化膜上に 11-HUPA の SAM を形成して蛍光分子を修飾し、ホスホン酸 SAM が有機シランよりも 4 倍高密度で、アルカリ溶液中で安定性が高いことを示しています。有機シランが Ti 酸化膜上に存在する OH 基としか反応できないのに対し、ホスホン酸誘導体は基板にプロトンを生供給することで OH を産生し、高密度に結合すると考えられています。

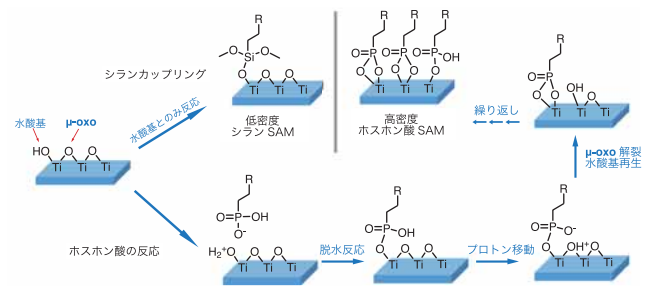


図 1 ホスホン酸誘導体が有機シランより高密度な SAM を形成する理由

<ホスホン酸 SAM 作製例>

1. 基板を界面活性剤水溶液 (0.5% SDS) に浸漬し、20 分間超音波洗浄する。
2. 純水、アセトン、エタノールで順次、20 分間超音波洗浄する*1)。
3. 1 mmol/l ホスホン酸誘導体のエタノール溶液に 1 時間浸漬する。
4. エタノールで洗浄後、窒素で風乾する。
5. 120℃で 1 時間加熱処理する*2)。

*1) 基板の洗浄は、酸素 / プラズマ、UV / オゾン処理などで代替できる。

*2) 加熱処理により基板の水酸基とホスホン酸の脱水縮合が進み、SAM が安定化する。

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
11-AUPA	10 mg	13,800	A517
	100 mg	38,200	A517
10-CDPA	10 mg	11,000	C490
	100 mg	30,000	C490
FHFA	10 mg	9,800	F340
	100 mg	28,000	F340
FOPA	10 mg	9,800	F329
	100 mg	28,000	F329
FDPA	10 mg	13,000	F330
	100 mg	36,000	F330

品名	容量	希望納入価格(¥)	メーカーコード
M-EG ₃ -UPA	10 mg	13,800	M457
	100 mg	38,200	M457
11-NUPA	10 mg	11,000	N468
	100 mg	30,000	N468
11-HUPA	10 mg	11,000	H399
	100 mg	30,000	H399
ODPA	10 mg	11,000	O407
	100 mg	30,000	O407
11-PIUPA	10 mg	11,000	P463
	100 mg	30,000	P463

<ホスホン酸 SAM 接触角測定例>

前ページの方法で ITO 基板*3)をホスホン酸誘導体で修飾し、水の接触角を測定した例を表 1 に示します。

製品の FOPA、ODPA、M-EG₃-UPA、11-HUPA、11-PIUPA、10-CDPA、11-PUPA 及び試作品の MC-PUPA、DF-PUPA、DC-PUPA の 10 種類のホスホン酸修飾 ITO 基板のそれぞれ 2 点で接触角を測定しました。

*3) ジオマテック株式会社の FLAT ITO 膜付きガラスを 20 mm × 20 mm に切断したものを使用した。

表 1 各種ホスホン酸誘導体で修飾した ITO 基板の水の接触角測定結果

サンプル名	測定 1	測定 2	平均
未洗浄 ITO	58.60	61.70	60.15
洗浄後 ITO	14.80	16.50	15.65
FOPA	83.50	85.40	84.45
ODPA	100.30	100.10	100.20
M-EG ₃ -UPA	67.40	66.90	67.15
11-HUPA	65.00	68.60	66.80
11-PIUPA	71.50	68.20	69.85
10-CDPA	66.20	65.40	65.80
11-PUPA	84.40	84.90	84.65
MC-PUPA	85.40	85.80	85.60
DF-PUPA	79.60	81.80	80.70
DC-PUPA	80.50	84.90	82.70

ホスホン酸 SAM の安定性は標識する基板によって変わります。TiO₂ や Al₂O₃ 上では比較的安定性の高い SAM が形成されますが、シリコン酸化膜 (SiO₂) 上のホスホン酸 SAM は加水分解されやすいことが知られています。Thissen らはこの安定性の低さを解決するべく、SiO₂ 上に Al₂O₃ 層を形成し、その上にホスホン酸 SAM を形成して安定な皮膜を形成させることに成功しています。

<ホスホン酸 SAM 作製例: SiO₂ 基板に Al 層形成後、SAM 修飾>

- 1) シリコンウェハーを Piranha 溶液に 80℃ で 30 分浸漬する。
- 2) 純水で洗浄後、1 mmol/l AlCl₃ 水溶液に数時間浸漬する。
- 3) 純水で洗浄後、1 mmol/l ホスホン酸メタノール溶液に 12 時間浸漬する。メタノールで洗浄後、窒素で風乾する。

* 図 2 は上記方法で作製した基板と、AlCl₃ 水溶液浸漬を省いた基板上に落とした水滴の接触角の経時変化を測定した結果である。Al 層形成をしない場合は接触角が数十分の単位で劇的に減少するのに対し、Al 層形成を行った基板では劣化が抑えられている。

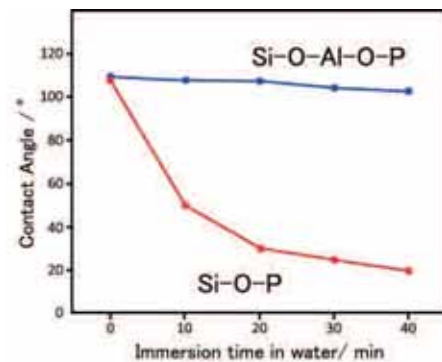
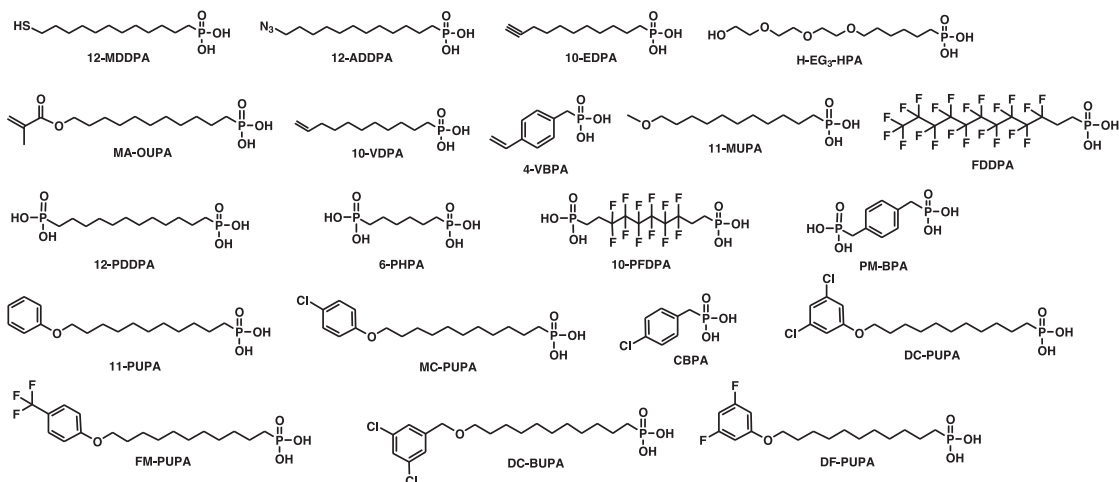


図 2 ホスホン酸 SAM で修飾した SiO₂ 基板上的水滴の接触角変化。アルミ活性化の有無での比較。

<試作品> ご興味のある方は小社までお問合せ下さい



24th フォーラム・イン・ドージン開催後記 「生体硫化水素(*bio H₂S*)- 原始環境が用意したシグナル分子」

硫化水素は毒ガスとして知られ、世間の受けはあまりよくない。ところが最近、体の中でもごく少量作られていることが分かってきた。しかも細胞保護効果や抗酸化能といった、毒とは正反対の作用があるらしい。その生理的な作用に焦点をあて、今年のフォーラム・イン・ドージンが11月15日に熊本市で開催された。酸素がない太古の還元的な環境では、硫化水素は生命活動を支えるエネルギー分子として重要な役割を担っていたと思われる。副題の「原始環境が用意したシグナル分子」には、そのような思いが込められている。現在の酸化的な環境において、還元的な硫化水素分子は様々な分子形態をとらうるため捉えるのが難しいが、そのことが逆に広い酸化還元状態に適応して、この分子が太古から用いられてきた理由ではないか、そして今、その役割が少しずつ解明されようとしている。テーマの特殊性から、当初、参加者が少ないのではないかと心配されたが、実際には県外からの参加者も多く、この分野への関心の高さが実感された。

の感はあるが、この分野に光を当てることで、少しずつ全体像が明らかになってきているが、同時に、研究を加速するための試薬が強く望まれているのも事実である。



フォーラムでは最初に国立精神・神経医療研究センターの木村先生がオーバービューを話され、多くの質問が集中し内容のある議論になった。つづく野中先生(岩手医科大学)と永原先生(日本医科大学)が硫化水素の産生酵素の話をされ、中川先生(名古屋大学)が硫化水素ドナーの開発についての研究を紹介された。午後の後半のセッションでは、木村先生(大分大学)が糖尿病との関係、梶村先生(慶応大学)が一酸化炭素シグナリングとの関わりについて話され、多くの参加者の関心を引いたようだった。また、同仁化学研究所では関連する製品の開発を行っており、ランチョン・セミナーでは開発担当者による発表も行い、多くの反響をいただいた。(佐々本一美)



要旨集の残部がございますので、ご希望の方は小社マーケティング部までお問い合わせください。

硫化水素は不安定で、細胞内では酸化されてポリサルファイドとなり、さらにこれらが内因性のチオールと反応し、パーサルファイドを形成する。また、これらの分子は容易にシグナル分子である一酸化窒素や過酸化水素とも反応し、それぞれニトロソチオールやスルフェン誘導体を与える。さらには、鉄-硫黄クラスターのような重要な働きをもつ別の硫黄源との相互作用も考えられる。それぞれの分子や経路が複雑に絡み合い、分子ネットワークを形づくっているように思われる。まだ「群盲象を撫でる」

ホームページアドレス
URL : <http://www.dojindo.co.jp/>
E-mail : info@dojindo.co.jp

フリーファックス 0120-021557
フリーダイヤル 0120-489548